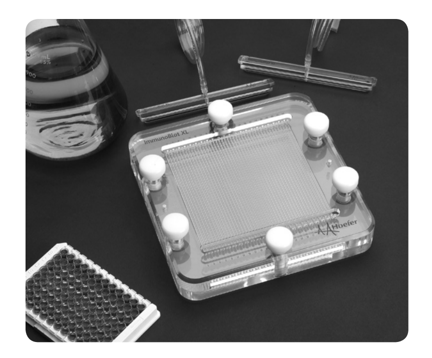


Español

ImmunoBlot y ImmunoBlot XL

Manual de instrucciones





PR645-IM/Spanish/Rev.B0/08-12



Tabla de contenidos

Introducción

La transferencia de proteínas o ácidos nucleicos, fraccionados mediante electroforesis en gel, para una superficie de la membrana inmovilizar aumenta la sensibilidad de una amplia gama de métodos de detección, reduce el tiempo de análisis y hace posible secuencial de sondeo. En particular, se ha hecho posible utilización de procedimientos inmunológicos que no son prácticas para llevar a cabo en un gel. Para material de ensayo en una hoja de membrana con sondas diferentes simultáneamente comúnmente requiere primero el corte de la membrana en una serie de tiras paralelas. Este procedimiento sin embargo destruye la correspondencia entre los carriles o posiciones diferentes sobre un gel.

El ImmunoBlot® y ImmunoBlot XL mantener esta correspondencia y reducir al mínimo el volumen de los reactivos necesarios para la detección de carriles individuales. Dos placas de plástico transparente, suave y una con los canales, sujetar un 15 × 15 cm membrana de transferencia para definir y separar los carriles de gel de originales en los canales individuales. Estos canales separados permiten el uso de reactivos de detección diferentes (anticuerpos primarios, secundarios conjugados anticuerpos, antígenos y/o sustratos de reacción) en cada canal.

Hay 2 aplicaciones principales de la ImmunoBlot-blot y ImmunoBlot XL:

Antisueros múltiple o sondas pueden ser probada contra una sola muestra de proteínas o ácidos nucleicos. La única muestra se carga toda la parte superior de un gel de losa, a continuación, ejecute y se transfirieron a una membrana. Cuando anclada en el ImmunoBlot, la membrana puede ser probada contra antisueros múltiple o sondas.

Un antisuero sola o la sonda puede ser probada contra antígenos múltiples o ácidos nucleicos.

Los dos modelos difieren en el número y el volumen de los canales de reacción. El ImmunoBlot cuenta con 25 canales que mantienen un volumen máximo de 250 µl cada uno. El ImmunoBlot XL cuenta con 45 canales que mantienen un volumen máximo de 140 µl cada uno.

Desembalaje e inventario

Quite el envoltorio de los paquetes cuidadosamente y comparar el contenido con la lista de empaque, asegurándose de que todos los elementos llegaron. Si falta alguna pieza, comuníquese con su oficina local de ventas. Inspeccione todos los componentes de los daños que puedan haber ocurrido mientras la unidad estaba en tránsito. Si alguna parte está dañada, póngase en contacto de inmediato al transportista. Asegúrese de guardar todo el material de embalaje para las reclamaciones por daños o utilizar en caso de ser necesario devolver la unidad.

Instrucciones

El siguiente detalle los pasos para el sondeo de una membrana con el ImmunoBlot.

Seleccione y bloquear la membrana



Seleccionar una membrana de elección (nitrocelulosa, Hybond ECL™; PVDF, Hybond P; bajo PVDF fluorescente, Hybond LFP) para el ensayo y se corta a:

Longitud: 15 cm

Ancho: Corte para dar cabida a los canales que se utilizarán, la anchura máxima para todos los canales: 15 cm



Membranas bloques con exceso no específica protein.[1]



Nota: Si las membranas bloqueadas han sido almacenados en una solución libre de proteínas, las vuelve a bloquear durante 1 a 2 minutos en una bandeja de solución de bloqueo.

Carga de la membrana



Retire la placa de acrílico de la ImmunoBlot y darle la vuelta.



Con la cara de antígeno de soporte de la membrana frente a los canales de ImmunoBlot, la posición de la membrana que cubre todo el channels.[2]



Colocar una almohadilla nuevo, sellado en seco (suministrado con la unidad) sobre la membrana.



Coloque la placa inferior de la unidad en la placa superior invertido de forma que los pasadores de alineación caer en su lugar.



Asegúrese de que no hay un espacio entre las placas superior e inferior.

[1] Véase el Apéndice A, Nota 1, El bloqueo de la membrana.

[2] Véase el Apéndice A, Nota 2, Alineación de la membrana.

Aspirar e introducir soluciones de anticuerpos

Recomendación: Utilizar una punta de pipeta desechable conectado a un aspirador de vacío de agua para este fin.



Aspirar el exceso de líquido de los canales a través de los agujeros numerados.

Nota: Para evitar el secado de la membrana, los canales deben ser cargados dentro de los cinco (5) minutos de aspiración.

¡Importante! Tenga cuidado de no tocar la punta de la pipeta en cualquier parte de la unidad, salvo en el agujero deseado de la muestra.



Pipeta solución de anticuerpo a través de los agujeros numerados.

Presione la punta de la pipeta con firmeza en cada hoyo y se inyecta el líquido rápidamente en una sola acción suave hasta que el canal está lleno. Tenga cuidado de no introducir burbujas.[3]



Añadir tampón a todos los canales no utilizados que cubren la membrana.

modelo	número de canales	volumen del canal aproximada[4]
ImmunoBlot	25	250 µl
ImmunoBlot XL	45	140 µl

Incubar



Coloque la unidad sobre una plataforma oscilante con los canales alineados en la dirección de balanceo.

Nota: Para obtener los mejores resultados, utilice una velocidad de balanceo lento (5 a 6 ciclos de inclinación por minuto). Una plataforma giratoria agitación no es eficaz para este propósito.



Incubar la unidad en la plataforma oscilante durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente.

[3]Véase el Apéndice A, Nota 3, La eliminación de las burbujas.

[4]Véase el Apéndice A, Nota 4, Los volúmenes óptimos.

Retire las soluciones primarias de anticuerpos y lavar la mancha

Utilizar el sistema de lavado para eliminar la solución de anticuerpo y lavar la mancha.



Posición de las 2 partes idénticas del sistema de lavado en las ranuras de cada lado de la placa superior y presione firmemente hasta que las juntas tóricas están sentados en la slots.[5]



Para aspirar todas las muestras simultáneamente, primero conectar partes de la tubería suministrada con la unidad para las dos partes del colector mediante una conexión luer. Ahora, conecte el extremo abierto del tubo de la pieza de colector a una trampa conectado a una fuente de vacío.

Luego coloca el extremo abierto del tubo de la pieza segundo colector en un vaso de precipitados que contenía tampón de lavado.

Al iniciar las soluciones de anticuerpo de vacío en los canales se eliminan y el tampón de lavado se extrae desde el otro lado. Por favor, consulte a su protocolo de detección occidental para obtener instrucciones de lavado. Para la detección occidental se recomienda al menos 2 lavados rápidos en el buffer seguido de dos lavados más en el buffer (5 minutos, mientras balanceo es suficiente) antes de la introducción de los anticuerpos secundarios.

[5]Véase el Apéndice A, Nota 5, Montaje de las juntas tóricas en las ranuras.

Introducir anticuerpo secundario y se incuba

La incubación del anticuerpo secundario puede realizarse tanto en la unidad o en una bandeja.[6]

Para llevar a cabo la incubación en la unidad de ImmunoBlot:



Se inyecta la solución secundaria de anticuerpos en los canales cuidadosamente con una pipeta de un solo o de varios canales.



Incubar la unidad sobre una plataforma oscilante con los canales alineados en la dirección de oscilación de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente.



Aspirar la solución de anticuerpo secundario utilizando una fuente de vacío o una pipeta como se ha descrito antes (página 5, paso 2) y lavar la mancha con tampón de lavado durante unos pocos segundos. El lavado de la mancha evita la contaminación cruzada de canales de diferentes anticuerpos secundarios a través de los canales al quitar la mancha de la unidad.

[6]Véase el Apéndice A, Nota 6, La incubación del anticuerpo secundario.

Retire y desarrollo de la mancha



Desenrosque el ImmunoBlot y separar las dos mitades.



Eliminar la almohadilla de sellado utilizado y se lava la membrana en una bandeja con 3 a 5 cambios de tampón para un total de 10 a 15 minutos.



Desarrollar la mancha, siguiendo las instrucciones de su kit de detección de Occidente (Véase también el Apéndice B).

Limpie el ImmunoBlot

Limpie la unidad después de cada uso mediante la realización de los siguientes:



Enjuague la unidad ImmunoBlot y sistema de lavado con agua destilada.

Recomendación: Una solución al 1% de solución de limpieza 7X (Flow Laboratories, 50 ml de concentrado en 5 litros de agua tibia).



Utilizar un no abrasivo, agente alcalino de limpieza de laboratorio que no deja residuos después del enjuague, tal como un detergente para la limpieza de artículos de vidrio destinado cultivo de tejidos. Los agentes concentrados de limpieza debe diluirse a la fuerza normal.



Sumerja la unidad de ImmunoBlot y de lavado, en la solución de limpieza y cepille suavemente con un cepillo suave teniendo cuidado de no rayar las superficies interiores.

Nota: No esterilizar la unidad de ImmunoBlot o sistema de lavado.

No exponga la unidad de ImmunoBlot con el alcohol u otros solventes orgánicos.



Lavar la unidad ImmunoBlot y lavado a fondo con colector de agua del grifo, seguido de agua destilada.

Para enjuagar fácilmente los pequeños agujeros numerados, montar la unidad y las unidades múltiples sin una membrana y la almohadilla de sellado, y enjuague con agua destilada.

Solución de problemas

problema	causas posibles	recomendaciones
Fugas - solución de anticuerpos se ha trasladado a los canales adyacentes.	Las áreas secas de la membrana para actuar como mechas fluido de las zonas adyacentes.	Siempre pre-mojado de la membrana antes de montar en la unidad. Llenar cada canal, que cubre la membrana con tampón.
	Membrana no cubren toda la longitud del canal.	Asegurarse de que la membrana se corta al tamaño apropiado.
	El líquido en los canales sobrecargados se derramó cuando la unidad fue sacudida provocando la contaminación de los canales adyacentes.	No llene en exceso canales.
	Vuelva a utilizar las almohadillas de sellado no se ha sellado correctamente.	No vuelva a usar almohadillas de sellado, ya que comprime durante el uso.
	Bandeja de incubación.	Considere la posibilidad de incubación de la mancha con el anticuerpo secundario en el ImmunoBlot en lugar de incubación de la bandeja. (Véase el Apéndice A:. Nota 6.)
	Membrana es despojado de bloqueo proteína.	Por favor, tenga cuidado de no quitar la mancha de bloquear la proteína, mientras que el lavado antes de la adición de anticuerpos primarios. Por favor, siga las instrucciones de su kit de detección de Western Blot. Un protocolo de la muestra se da en el Apéndice B.
	Canales sin lavar contenía anticuerpos que contaminó el experimento.	Limpie la unidad después de cada uso. Para consejos de limpieza, consulte la sección Limpieza del ImmunoBlot, en la página 7.
Sensibilidad baja	Cuando baja afinidad o anticuerpos bajos de titulación se utilizan a alta dilución (1:100.000 o mayor), una cierta disminución en la intensidad de señal puede ser observada. Los anticuerpos pueden agotarse en el pequeño volumen del canal de ImmunoBlot.	Aumentar la concentración de anticuerpos doble 2-5. Aumentar el volumen de solución de anticuerpos por canal. Para ello, inserte el estándar 200 µl puntas de pipeta de plástico en los puertos de entrada tanto para cada canal. Estos servirán como depósitos para volúmenes de muestra grandes que el volumen de la propia canal, mientras que la incubación en el agitador. Inyectar la muestra de anticuerpos con una punta que se queda en la puerta de entrada y se convierte en un depósito. Realice las incubaciones de secundaria de anticuerpos en una bandeja. (Véase el Apéndice A, la nota 6.)

problema	causas posibles	recomendaciones
Burbujas (Nota: Las pequeñas burbujas se mueven generalmente cuando la unidad se balancea y no suelen afectar a los resultados)	Las soluciones son demasiado frío. Gas disuelto sale de la solución a medida que aumenta la temperatura.	Llevar soluciones a temperatura ambiente antes de cargar las muestras.
	Canales de contenidos residuales de gotas de líquido antes de las muestras se cargaron.	Incline la unidad y el líquido aspirado desde el extremo inferior de cada canal con una punta de pipeta de plástico unido a un fuerte vacío.
	Técnica de pipeteo inadecuado se utilizó.	Asiento la punta de la pipeta firmemente en el agujero numerados y dispensar la muestra con una suave acción clave.
	Almohadillas de sellado estaban húmedos antes del montaje.	Asegúrese de que las almohadillas de sellado estén secos antes de su montaje en el ImmunoBlot.
	La mala calidad o una pipeta mal mantenido introducido burbujas en los canales.	Trate de inyección de muestras con una pipeta u otra marca de la punta.
	Las burbujas formadas en el tiempo.	Coloque una capa de plástico entre la membrana y la almohadilla de sellado.
Múltiple es difícil de insertar.	Las juntas tóricas pueden o sin lubricación.	Para lubricar: • Quitar las juntas tóricas cuidadosamente con la punta de una espátula plana de pesaje. • Aplique grasa de silicona a la ligera. • Vuelva a instalar.

Apéndice A: Notas técnicas

Nota 1: El bloqueo de la membrana

Membranas siempre deben ser bloqueadas antes de montar en el ImmunoBlot. Por favor, siga las instrucciones de bloqueo proporcionado en el kit de detección de Western Blot.

En general, 5% sin grasa de la leche seca o 5% de BSA se utilizan como agentes bloqueantes.

El bloqueo con detergentes Tween-20 u otro por sí solas no se recomienda ya que puede causar la lenta difusión lateral de proteínas a través de la membrana de nitrocelulosa. Se recomienda realizar el paso inicial de bloqueo en una solución que contiene proteínas (tales como 5% de BSA) sin detergente. Evitar lavados extensos con soluciones que no contienen la proteína antes de montar la membrana en la inmunotransferencia.

En muchos casos, el bloqueo satisfactorios pueden ser alcanzados por incubación con PBS/10% ternero recién nacido serum/0.1% de Tween-20 para un mínimo de una hora a temperatura ambiente. Sin embargo, los agentes de bloqueo difieren en su eficacia dependiendo de las circunstancias. Para borrones de lisados de células enteras, bloqueando con suero al 50% a 100 puede ser muy eficaz en la reducción de la unión no específica.

Nota 2: La alineación de la membrana

Por Western Blot experimentos es importante que los carriles y las bandas de proteína en la membrana se alinean con los canales de la unidad de ImmunoBlot. Esto se puede lograr en 2 pasos:

Paso 1.

Utilice la especialmente diseñada ImmunoBlot peines en el momento de la electroforesis. Esto asegura que los carriles en el gel y, posteriormente, los carriles y las bandas de proteína en la mancha, están alineados con los canales en el ImmunoBlot.

Los peines con separaciones, así que coincidan con las separaciones de carriles de las unidades de ImmunoBlot se enumeran a continuación. Tenga en cuenta que el número de pozos no siempre coincide con el número de carriles en una proporción 1:1.

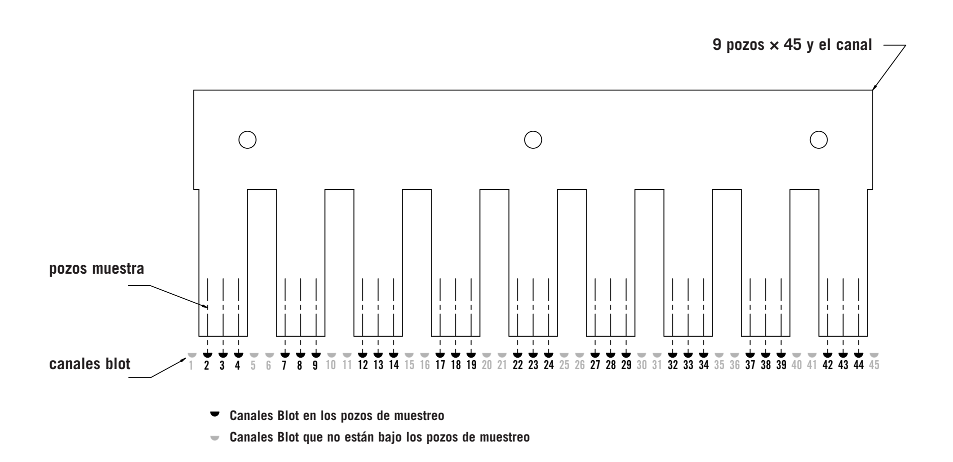


Fig A. El peine 9-bien 1,0 mm (PR511-9-1.0) se alinea con los 45 canales de la ImmunoBlot XL y se puede utilizar para sondear 9 muestras con hasta tres sondas por muestra.

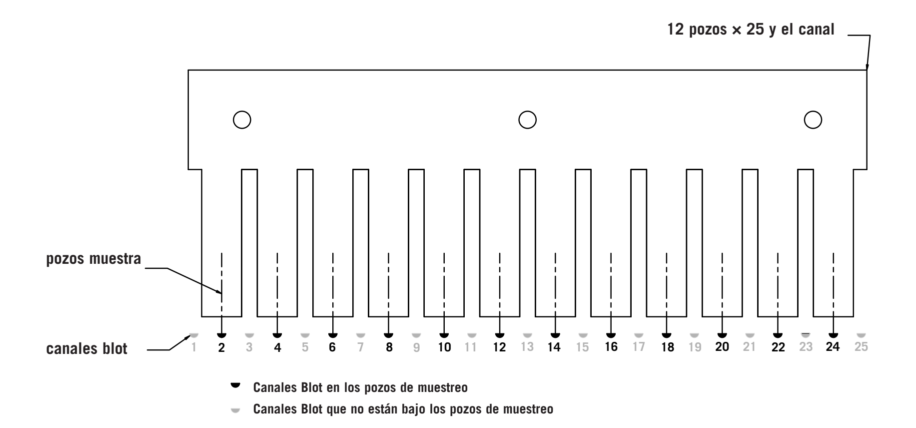


Fig B. Los 12-así 1,0 mm peine (PR511-12-1.0) se alinea con los 25 canales de el ImmunoBlot y se puede utilizar para sondear 12 muestras con una sonda por muestra.

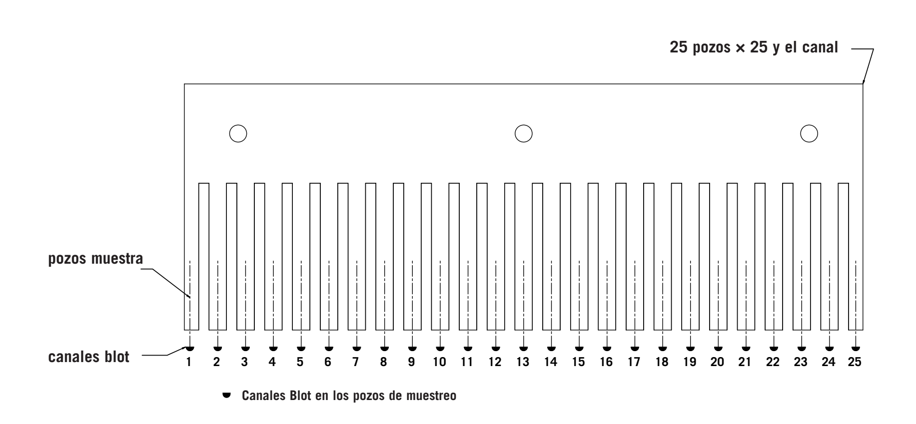


Fig C. El 25-así 1,0 mm peine (PR511-25-1.0) también se alinea con los 25 canales de el ImmunoBlot y se puede utilizar para sondear 25 muestras con una sonda por muestra.

Paso 2.

Después de que los geles son borrados, las bandas en la membrana no son visibles. Adición de un colorante no reactivo hará que sea fácil para alinear la membrana. Esto puede hacerse en una de dos maneras:

A. Para cargas de proteínas más grandes (>250 ng) Ponceau S se pueden utilizar para teñir las proteínas de forma reversible en la membrana después de la transferencia electroforética.

Enjuague la membrana brevemente en agua y las manchas en un 0,2% Ponceau S por 1 a 2 minutos, luego destain en varios cambios de agua destilada hasta que las bandas rojas aparecen sobre un fondo blanco. Puesto que la mancha se pierde durante la etapa subsiguiente de bloqueo, bandas de proteínas se debe marcar en esta etapa con agujeros o con un lápiz puntiagudo. La transferencia también puede ser fotocopiada.

Manchas teñidas Ponceau S se pueden almacenar durante meses a 4 °C, se mantuvo húmeda entre las hojas de parafina o tampón saturado de papel de filtro. Borrones también puede congelarse en una bolsa de plástico.

Polvo Ponceau S se debe disolver en agua destilada para obtener una solución de trabajo. La solución se puede reutilizar para varias semanas o meses, dependiendo del número de manchas membranas.

B. Para cargas de proteínas menores (<250 ng), verde de metilo, Y pironina o Deep Purple puede ser utilizado para marcar permanentemente la parte superior e inferior del gel para la alineación posterior con los ImmunoBlot canales.

Al cargar el gel, añadir aproximadamente 5 µl de verde de metilo (0,1% de solución en 50% de glicerol) o pironina Y (0,05% de solución en glicerol al 50%) a los carriles deseados. Estos colorantes migran justo por delante del frente de colorante azul de bromofenol en el gel, y transferirá permanentemente a la membrana. Una segunda alícuota del colorante añadido al gel cerca del final de la electroforesis entrará en el gel de resolución dentro de 5 a 10 minutos y sirven para marcar la parte superior del gel. Por favor, tenga en cuenta que estos tintes fluorescentes pueden interferir con los métodos de detección de Western Blot y por lo tanto, debe ser removido antes de la imagen. Si se deja sobre la membrana que dará lugar a señales no específicos en la detección fluorescente de Western Blot.

Nota 3. La eliminación de las burbujas

Las pequeñas burbujas en los canales generalmente no afectan a la reacción final, y debe moverse adelante y atrás sobre la superficie de la membrana cuando la ImmunoBlot se sacudió. Para eliminar las burbujas grandes, retirar la solución desde el canal y volver a inyectar. Para más información, consulte la sección Solución de problemas.

Nota 4. Volúmenes óptimos

El volumen óptimo para los canales ImmunoBlot variará ligeramente dependiendo del tipo de membrana utilizada. La solución añadida debe casi (95%) llenar todo el canal. Reducir el volumen si la solución se derrama de la puerta de entrada cuando la unidad se incuba en una plataforma oscilante.

Nota 5. Montaje de las juntas tóricas en las ranuras

Si las unidades de lavado múltiples no encajan en las ranuras con facilidad, aplique una pequeña cantidad de grasa de silicona alrededor de las juntas tóricas. Coloque la unidad del colector suelto en la ranura y presione hacia abajo en el lado del colector hacia usted. A continuación, pulse en el lado opuesto de usted para el asiento del colector de firmeza en la ranura.

Nota 6. Incubaciones anticuerpo secundario

Nota: Tenga precaución al realizar las incubaciones de la bandeja ya que los anticuerpos de baja afinidad monoclonales pueden disociarse de sus respectivos antígenos a través del tiempo. La incubación en una bandeja permite tales anticuerpos para difundirse a través de la solución de incubación y volver a enlazar en otra parte de la mancha. Tal rayas es detectable como tinción entre los carriles de muestra o en los carriles de control negativo en la posición de una o más bandas fuertemente reactivos.

Por favor, siga las instrucciones incluidas con el sistema de detección de Western Blot. Cuando el anticuerpo secundario se utiliza en la ImmunoBlot en una alta dilución (1:100.000 o mayor), una cierta disminución en la intensidad de señal puede ser observada. Esto puede ser debido al agotamiento de los anticuerpos en el pequeño volumen del canal. El problema generalmente puede ser corregido por:

1. Aumentando la concentración de anticuerpos 2-5 veces
2. Aumentando el volumen de anticuerpos, o
3. La eliminación de la membrana de la unidad y la realización de la incubación del anticuerpo secundario en una bandeja.

Apéndice B: Detección utilizando ECL Western Blot los sistemas de detección

Hoefer le recomienda que realice el etiquetado y la detección de manchas de acuerdo con las instrucciones que aparecen en el etiquetado de Western Blot y un kit de detección. A continuación se muestra un protocolo general basado en el de GE Healthcare (anteriormente Amersham Biosciences), ECL Western Blotting Kit de detección.

Hay varios ECL Western Blot sistemas de detección disponibles.

El siguiente protocolo general se sugiere:



Después de la electroforesis y la transferencia de proteínas separadas a nitrocelulosa o PVDF (bajo Hybond LFP fluorescente para mayor sensibilidad) de la membrana, bloquear los sitios no específicos con una solución adecuada de bloqueo.



El bloqueo es seguido por dos lavados rápidos en PBS/0.1% de Tween (PBS-T).



Sumergir e incubar la membrana con un anticuerpo primario antígeno-específica de concentración optimizado.



Quitar la membrana con dos lavados rápidos de PBS-T seguido por 2 lavados más largos (2 × 5 minutos con balanceo).



Incubar la membrana con una concentración óptima del anticuerpo secundario conjugado.



Brevemente enjuague la membrana con dos cambios de tampón de lavado seguido de 4 lavados más con PBS-T (4 × 5 min con balanceo).



Detección de la solución A y B se mezclan y se pipetearon sobre la membrana para una incubación corto.



Escurrir el exceso de reactivo de detección y envolver la membrana en Saran Wrap-antes de la exposición a rayos X película.

Información para pedidos

producto	cantidad	código
ImmunoBlot, para su uso con membrana estándar gel de tamaño (por ejemplo SE600). 25 carriles sonda espaciados 5,3 mm. Incluye la placa superior, placa inferior, 2 tornillos, sistema de lavado (2 piezas), 2 piezas de tubería, conectores de tubo, y 5 pastillas de sellado.	1	PR625
ImmunoBlot XL, para su uso con membrana estándar gel de tamaño (por ejemplo SE600). 45 carriles sonda espaciados 3,0 mm. Incluye la placa superior, placa inferior, 2 tornillos, sistema de lavado (2 piezas), 2 piezas de tubería, conectores de tubo, y 5 pastillas de sellado.	1	PR645
Almohadillas de sellado de plástico	10	PR630-31
Kit de lavado del colector	1	PR630-32
Juntas tóricas	2	PR630-33
Colector de conectores Luer	4	PR630-34
Tornillo de sujeción	1	PR630-36
Bandeja superior para PR625	1	PR625T
Bandeja superior para PR645	1	PR645T
Fondo de la placa	1	PR630-37
Peine, 9 pozos 1,0 mm	1	PR511-9-1.0
Peine, 12 pozos 1,0 mm	1	PR511-12-1.0
Peine, 25 pozos 1,0 mm	1	PR511-25-1.0



Hoefer, Inc.
84 October Hill Road
Holliston, MA 01746

Llamada gratuita: 1-800-227-4750
Teléfono: 1-508-893-8999
Fax: 1-508-893-0176
E-mail: support@hoeferinc.com
Web: www.hoeferinc.com

Impreso en el USA.

